OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Sequential Protooncogene Expression During Regeneration in Rat Stomach
Author(s)	伊藤, 敏文
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37124
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名・(本籍)	伊藤敏文
学位の種類	医学博士
学位記番号	第9098号
学位授与の日付	平成2年3月24日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Sequential Protooncogene Expression During Regeneration in Rat Stomach (ラット胃粘膜再生過程における細胞性癌遺伝子の発現動態)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 森 武貞　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

〔目 的〕

細胞性癌遺伝子の連続的発現は，細胞の再生・増殖にむすびつき，ＤＮＡ合成の亢進に先立つ一連の制御された遺伝子発現と考えられている。しかし，胃粘膜再生・修復過程でのこれらの遺伝子発現の経時的変化および，ＤＮＡ合成亢進の解析はなされていない。そこで，細胞性癌遺伝子であるc-myc，c-Ha-ras遺伝子の発現とＤＮＡ合成の関連を，“in situ” hybridization histochemistryと免疫組織化学を用いて検討し，粘膜再生・修復機構の分子生物学的解析を行った。

〔対象及び方法〕

1) 動物モデル：

Sprague-Dawley雄性ラット(200−300g)に，indomethacin(ＩＮＤ)を胃管により50mg/kg B. W. 投与して胃粘膜障害を作製した。ＤＮＡ合成観察の為に5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)(50mg/kg B. W.)を静脈内に投与した。

2) probeの調整：

v-myc(Pst I-Pst I, 1.52kb)および，v-Ha-ras(Hind Ⅲ-Hinb Ⅲ，0.88kb)のcDNA fragmentを^{35}S-deoxy ＣＴＰで標識した。negative controlとして同様に標識したpBR322 DNAを用いた。probeの比活性は，10^8〜10^9cpm/ug DNAであった。

3) 組織標本の作成：

経時的に燐酸緩衝２％paraformaldehyde溶液で灌流固定し，胃を取り出し後固定を行った。クライオスタットにて，厚さ８－12 μm凍結切片を作製し，ゼラチンスライド上に貼付した。

4）“in situ” hybridization histochemistry：

スライドグラス上の切片を，１時間室温でprehybridizationした後，^{35}Sで標識したprobeをスライド当り１ngを含むhybridization溶液と45℃，12～16時間反応させ，その後microautoradiographyを行った。５～10日後に現像定着し，Mayer's hematoxylin染色を行った。また，反応の特異性確認のため，^{35}Sで標識化したpBR322 DNAを用いて，同様の反応操作を行った。

5）免疫組織化学：

連続切片を用いて免疫組織化学的検討を加えた。この検討に使用した抗体は，羊抗P 62$^{c\text{-}myc}$抗体，ラット抗P 21$^{c\text{-}Ha\text{-}ras}$ 抗体，家兎抗ヒスチジン脱炭酸酵素（ＨＤＣ）抗体（阪大，和田教授より供与），マウス抗BrdU抗体である。

〔結　果〕

1）正常胃粘膜：

正常胃体部粘膜においてc-myc遺伝子，c-Ha-ras遺伝子の発現細胞は認められなかった。

2）病理学的観察：

ＩＮＤ投与３時間後より，出血性粘膜病変が胃体部に認められ，投与６時間後には，病変が最大となった。以後，病変の治癒傾向となることが認められた。

3）c-myc遺伝子の発現：

ＩＮＤ投与３時間後に，そのmRNAの発現は最大となり，P 62$^{c\text{-}myc}$蛋白は３時間から６時間後にかけて認められた。その遺伝子発現細胞は，病変部とその周囲の粘膜頸部に分布する粘膜頸細胞と壁細胞および，腺底部に分布する壁細胞，主細胞と，ＨＤＣ免疫反応陽性で確認されるenterochromaffinlike cellであった。pBR322 DNAを用いたnegative controlでは，特異的な銀粒子の集積は，各々の時間経過で認められなかった。

4）c-Ha-ras遺伝子の発現：

ＩＮＤ投与６時間後から12時間後にmRNAの発現が観察され，P 21$^{c\text{-}Ha\text{-}ras}$蛋白は，６時間後から24時間後に認められた。その遺伝子発現細胞の種類は，c-myc遺伝子発現細胞と同一であり，また，その分布も同様であった。

5）ＤＮＡ合成細胞の同定：

BrdU取り込み陽性で同定されるＳ期細胞は，正常群およびＩＮＤ投与18時間後までは粘膜頸部に限局していたが，時間経過と共にＳ期細胞は増加する傾向で観察された。一方，ＩＮＤ投与24時間後には，粘膜頸部の細胞のみならず，病変部の腺底部細胞にもＳ期細胞は分布し，その分布は，c-myc，c-Ha-ras遺伝子の発現細胞の分布とほぼ一致していた。連続切片によりP 21$^{c\text{-}Ha\text{-}ras}$蛋白とBrdU陽性物質が同一の細胞に観察された。

〔総　括〕

胃粘膜再生・修復過程において，ＤＮＡ合成の亢進に先立って，ｃ-ｍｙｃ遺伝子，ｃ-Ｈａ-ｒａｓ遺伝子の連続発現が，病変周囲の粘膜頸細胞，壁細胞，主細胞および，ｅｎｔｅｒｏｃｈｒｏｍａｆｆｉｎｌｉｋｅ ｃｅｌｌ に観察された。

このことから，これらの細胞性癌遺伝子の連続発現が，他の細胞の場合と同様に胃粘膜再生・修復過程においても，重要な役割を担っていることが示唆された。また，従来から報告されている胃底腺部細胞すなわち，壁細胞，主細胞および内分泌細胞の自己増殖能を遺伝子発現の面からも証明するものと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究では，ラットのインドメサシンによる胃粘膜病変後の粘膜再生・修復過程を対象とし，細胞性癌遺伝子であるｃ-ｍｙｃ，ｃ-Ｈａ-ｒａｓ遺伝子の連続発現とＤＮＡ合成の関連を，“ｉｎ ｓｉｔｕ” ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙとｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙとを用いて細胞レベルで検討したものである。ＤＮＡ合成の亢進に先立ちｃ-ｍｙｃ遺伝子は，病変発生の早期より発現が増強し，続いて，ｃ-Ｈａ-ｒａｓ遺伝子の発現増強が認められた。 その発現は，障害粘膜の周囲とその腺底部の細胞であり，その発現細胞は，胃粘膜の幹細胞である粘膜頸細胞のみならず分化した機能を有する壁細胞，主細胞および内分泌細胞の一つであるＨＤＣ陽性細胞，即ちｅｎｔｅｒｏｃｈｒｏｍａｆｆｉｎ-ｌｉｋｅ細胞であることが同定された。

本研究は，再生胃粘膜においてはじめて，細胞性癌遺伝子発現をｉｎ ｓｉｔｕで解析したものである。この検討は，再生胃粘膜における細胞性癌遺伝子の役割を明らかにする上で，多大の貢献をもたらすものであり，学位に値するものと考える。